

CONTRÔLE MORPHOGÉNÉTIQUE DE LA DIFFÉRENCIATION DES SCLÉROTÉS DE *SCLEROTINIA FRUCTIGENA* : II - ÉTUDES CYTOLOGIQUES ET ULTRASTRUCTURALES

par L. NAJIM*

RÉSUMÉ — Le « shift-down » de température permet de suivre aisément le développement de tous les stades de différenciation des sclérotés, des primordia à la maturation, facilitant ainsi des études cytologiques et ultrastructurales sur les primordia

Les primordia de sclérotés du *Sclerotinia fructigena* montrent un développement important des hyphes intra-hyphales, une mélanisation des hyphes principales et des transformations ultrastructurales de quelques organites, particulièrement le système vacuolaire, les microcorpuscules (« microbodies »), les noyaux, le reticulum endoplasmique, les accumulations fibrillaires et les mitochondries.

Cette réorganisation structurale durant la différenciation des primordia va dans le sens d'une recherche d'un nouvel équilibre physiologique, c'est-à-dire, d'un état de croissance active représenté par l'hyphe végétative vers un état de vie au ralenti : le sclérote.

SUMMARY - The shift-down of temperature permits to follow easily the development and differentiation of all states of sclerotia : from primordia to a maturation and facilitates cytological and ultrastructural studies.

Sclerotial primordia of *Sclerotinia fructigena* show an important development of intra-hyphal hyphae, a melanization of principal hyphae and ultrastructural transformations of some organelles, particularly vacuolar system, microbodies, nuclei, endoplasmic reticulum, fibrillar accumulations and mitochondria.

This structural reorganization during primordia differentiation are in the way of a research of a novel equilibrium : that is to say from one state with a high level of rate growth represented by the vegetative hyphae to a state of slow rate of growth : the sclerotia.

MOTS CLÉS : *Sclerotinia fructigena*, sclérote, primordia, hyphes principales, hyphes intra-hyphales, équilibre libre physiologique, mélanines.

* Laboratoire de Cryptogamie, Faculté des Sciences de Rabat, avenue Ibn Babota, B.P. 1014, Rabat - MAROC.

INTRODUCTION

La morphogenèse et le développement des sclérotos ont été étudiés par divers auteurs (WILLETTS, 1968a-b, 1969, 1972 ; CHET & HENIS, 1975).

Sur le plan morphogénétique, les sclérotos sont formés de deux parties : le cortex et la médulla. Le cortex est feutré et plus ou moins hyalin, il entoure la médulla qui est constituée d'un ensemble d'hyphe agglutinées les unes contre les autres et qui sont riches en substances nutritives (WILLETTS, 1972, 1978).

En général, leur développement se déroule en trois étapes successives : une étape d'initiation qui consiste en une différenciation des primordia, suivie d'une étape caractérisée par un accroissement de la taille et enfin une étape de maturation où l'on distingue nettement le cortex de la médulla.

Les différentes étapes sont conditionnées par les facteurs trophiques et physiologiques qui jouent un rôle déterminant dans le contrôle de la différenciation des sclérotos. Cette différenciation s'accompagne de changements physiologiques et cytologiques importants, car ils marquent le passage à la vie au ralenti.

Dans les conditions de croissance normales, les sclérotos de *Sclerotinia fructigena* commencent leur différenciation à la fin de la conidiogenèse, et plus particulièrement de la macroconidiogenèse. En effet, dans les conditions naturelles, la fin de l'étape de la macroconidiogenèse constitue le point de départ de la différenciation des sclérotos.

Toutefois, l'étape de la macroconidiogenèse n'est pas nécessairement obligatoire, car avec le système de transfert (NAJIM, 1987) on peut induire une différenciation absolue de sclérotos en utilisant seulement les facteurs physiques comme stimuli.

Les données sur la différenciation des sclérotos étant acquises, nous les avons utilisées dans un double but ; d'une part pour étudier les changements morphologiques et cytologiques qui accompagnent la différenciation des sclérotos tout en les comparant parallèlement avec les structures déjà observées de l'hyphe végétative (NAJIM & TURIAN, 1979a) et de l'hyphe conidiogène (NAJIM & TURIAN, 1979b). Ce travail permettra de mieux comprendre les phénomènes de passage d'un état de croissance active à un état de vie au ralenti, qui peut durer plusieurs années.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches et méthodes culturales

La souche de *Sclerotinia fructigena* utilisée a été déjà décrite (NAJIM, 1987). Toutefois, l'induction des primordia a été suivie sur des cultures ayant poussé pendant 7 jours à l'obscurité à 23°C, puis transférées durant 48 ou 96 h à 3°C.

Microscopie électronique à balayage

Le matériel fongique est fixé selon la méthode décrite pour l'étude de l'ultrastructure de l'hyphe végétative du *S. fructigena* (NAJIM & TURIAN, 1979a). Toutefois, après la déshydratation à l'acétone (25, 50, 75 et 100%), les sclérotos sont sectionnés puis montés directement sur un porte-objet et couverts par une fine pellicule d'or pour assurer la conductivité.

Microscopie électronique à transmission

Des primordia de sclérotés, dont les stades de développement sont déterminés au microscope optique, sont prélevés et fixés pour la microscopie électronique à transmission.

Les primordia sont fixés de la même façon que les hyphes végétatives ; toutefois, la durée de fixation est étendue à 2 h pour la glutaraldéhyde à 2 %, et 2 h pour le tétr oxyde d'osmium à 2 % en raison de la forte agglutination des hyphes.

Le matériel est déshydraté à l'alcool (25, 50, 75 et 100 %) et enrobé dans du SPURR (1969).

Les coupes subissent successivement une double coloration d'abord à l'acétate d'uranyle à 2 % en solution aqueuse et puis au citrate de plomb selon la méthode de REYNOLDS (1963).

RÉSULTATS

Morphogénèse et différenciation des sclérotés

Une vue d'ensemble d'un sclérote de 4 mm, sectionné transversalement permet de distinguer le cortex et une zone centrale compacte, la médulla (Fig. 1).

Le cortex est constitué de plusieurs zones plus ou moins distinctes ; on y distingue une évolution structurale de l'extérieur vers l'intérieur (Figs. 2, 3). La partie externe du cortex est feutrée et l'organisation des hyphes y est très lâche, elles se croisent et s'entrecroisent formant ainsi des alvéoles ou des méats et donnant un aspect spongieux aux cortex (Fig. 2). La partie interne du cortex est constituée de cordons qui sont formés de trois ou quatre hyphes accolées longitudinalement (Fig. 3). Les cordons s'enchevêtrent également dans un sens ou dans un autre. Il n'existe pas de forme structurale particulière permettant de distinguer le cortex de la médulla ; toutefois, les hyphes s'organisent dans cette limite en un prosenchyme (Fig. 4). Par contre, les sclérotés, qui se développent dans le substratum, différencient un cortex réduit avec des hyphes aplaties qui s'entrecroisent et qui sont mélanisées (Fig. 5).

La médulla forme la partie centrale du sclérote, dont les hyphes sont mélanisées et structurées en un pseudoparenchyme (Fig. 4). Ces hyphes sont par ailleurs fortement liées entre elles par un ciment inter-hyphal.

Différenciation des primordia de sclérotés

Après 48 h de transfert des cultures végétatives à 3°C, les primordia commencent leur différenciation, ces derniers forment en premier le cortex (Fig. 6). Ces hyphes se croisent à plusieurs endroits, et sécrètent des mucopolysaccharides sous forme de fibrilles. Ces fibrilles maintiennent les hyphes reliées entre elles (Fig. 6). En outre, un certain nombre de transformations sont notées dans ces hyphes : une augmentation de la ramification (Fig. 7a), un épaississement de la paroi (Fig. 7b) et une mélanisation qui peut aussi toucher le cytoplasme (Fig. 7a,b).

Après 4 jours de transfert à 3°C, les organites des hyphes situées dans la zone intermédiaire entre le cortex et la médulla se remplissent d'un ciment en apparence formé de mélanines. Ces hyphes mélanisées et limitrophes à la médulla forment la barrière protectrice de cette dernière.

La médulla des primordia de sclérotos se différencie progressivement, les hyphes s'accolent à l'aide du ciment inter-hyphal sécrété par ces dernières et les parois s'épaississent fortement (Fig. 8). Par ailleurs, de nombreuses hyphes intra-hyphales sont localisées dans la médulla des primordia. Les structures des hyphes intra-hyphales sont en général préservées, alors que celles des hyphes principales sont entièrement colmatées par une substance opaque (Figs. 8-13).

Ultrastructure des organites et des différentes formations

Le système vacuolaire — Le système vacuolaire se développe dans les hyphes du cortex et dans celles de la médulla, il est formé de petites vacuoles à contenu très dense aux électrons de diamètre variable entre 1 et 2 μm (Figs. 10-12), et de vacuoles plus larges et à contenu moins dense aux électrons (Figs. 25-26). Dans le cas général, l'origine du système vacuolaire est lié au système réticulaire ; dans le cas du *S. fructigena*, il apparaît que la membrane nucléaire participe à l'élaboration des vacuoles (Figs. 22, 24).

En effet, certaines vacuoles d'origine nucléaire, dès les premiers stades de leur formation, peuvent séquestrer des organites (Fig. 23) et du matériel cytoplasmique (Figs. 16, 22, 24) et les « digérer » progressivement.

Cette digestion des organites, qui va dans le sens d'une recherche d'un nouvel équilibre structurel, se fait aussi par l'intermédiaire de vacuoles autophagiques (Fig. 25).

Les mitochondries sont progressivement digérées par les vacuoles autophagiques (Fig. 25), laissant apparaître après la lyse des structures de type myélinique (Fig. 26).

Les microcorpuscules (« Microbodies ») — Les microcorpuscules dans les hyphes de la médulla ont une membrane unique et une matrice dense finement granulaire, leur aspect général est tout à fait identique à ceux déjà décrits dans les hyphes végétatives, dans les macroconidies et les primordia de sclérotos (NAJIM & TURIAN, 1979b ; NAJIM & al., 1979).

A ce stade de différenciation, les microcorpuscules ne sont pas associés aux globules lipidiques (Fig. 12) qui constituent la principale source de réserve.

Les noyaux — Dès l'initiation des sclérotos, les noyaux (Figs. 8-9-13) deviennent progressivement sphériques et contiennent un nucléole fibrillo-granulaire (Fig. 8), et quelquefois des membranes intranucléaires (NAJIM, 1982a). Dans les hyphes marginales de la médulla, le déplacement des organites continue à se faire malgré la baisse de température. En effet, les noyaux peuvent encore migrer à travers un pore septal de 0.2 à 0.3 μm de diamètre (Figs. 15, 16).

Les septa — Comparé à l'hyphe végétative, où les septa ne sont pas épais, dans les sclérotos ces formations s'épaississent davantage et contiennent tout au long quelques granulations (Fig. 16), apparemment du même type que celles décrites dans les épaissements de paroi de *S. fructigena* (NAJIM 1982 b,c).

Réticulum endoplasmique — La chute de température fait subir au système endomembranaire des transformations importantes : le réticulum endoplasmique notamment s'organise d'une façon similaire à un appareil de Golgi (Figs. 17, 18). Les saccules du réticulum endoplasmique lisse s'empilent les uns sur les autres ; on peut dénombrer jusqu'à 8 saccules pour cet ensemble réticulaire à la figure 17.

Les extrémités de ces saccules sont digitées à la manière des dictyosomes (Figs. 17, 18). Sur ces microphotographies, il n'apparaît pas de différences d'épaisseur entre les deux membranes d'un même saccule (face supérieure et face inférieure).

Accumulations fibrillaires — Des formations de microfilaments sont abondantes dans les primordia de sclérotés (Figs. 19, 20). Ces microfilaments ont un diamètre de 60 à 70 Å, ils sont groupés en micro-réseaux et montrent une organisation cristalline en coupe transversale (Fig. 20).

Les mitochondries et les formations de figures myéliniques — Dans les primordia de sclérotés, les mitochondries ont une matrice moins dense aux électrons et présentent peu de crêtes [Fig. 9], elles sont comparables à celles des macroconidies [NAJIM, 1979]. Certaines de ces mitochondries ont des crêtes qui se transforment en corps myéliniques (ou en « whorls ») (Figs. 14, 21).

DISCUSSION

La biogenèse est dépendante de la masse des hyphes produites en culture et notamment des nombreuses hyphes intra-hyphales qui sont générées et qui caractérisent la formation d'une part de la médulla et d'autre part du cortex. Les hyphes intra-hyphales ont été aussi observées chez le mutant « clock » de *Neurospora* (LOWRY & SUSSMAN, 1966), chez le *Linderina* (CHAN & STEPHEN, 1967) ou encore chez le *Trichophyton* (FORLEY & al., 1975) ; selon ces auteurs, ce type de développement est lié à la régénération des champignons.

Cependant, ce phénomène apparaît comme déterminant dans la différenciation des sclérotés. En effet, sur le plan cytologique les hyphes intra-hyphales sont protégées et peuvent assurer la pérennité de ce champignon ou en quelque sorte la régénération de cette espèce. Le mode de formation de ces hyphes intra-hyphales reste en partie obscure ; selon CALONGE (1968) ces dernières se développeraient à partir des septa de *S. fructigena* ou encore à la suite d'anastomoses entre les différentes hyphes (CALONGE, 1968 ; HOFFMAN, 1972). Nos résultats tendent aussi à confirmer ces hypothèses.

Sur le plan cytologique, les hyphes intra-hyphales sont baignées dans un ciment probablement constitué de mélanines et se différencient des autres par leur paroi épaisse. L'origine de ce ciment serait probablement lié aux petites vacuoles au contenu dense aux électrons.

Ce ciment peut, en effet, assurer la protection des hyphes intra-hyphales qui pourront assurer la régénération de cette espèce.

La biosynthèse des polysaccharides pariétaux et extra-pariétaux est fortement activée durant la différenciation des sclérotés ; elle n'est donc pas inhibée par la chute de la température. Ceci ■ d'ailleurs été confirmé par DARGENT & al. (1984).

Le rôle des mélanines est probablement de protéger les structures qui persistent dans les sclérotés et leur accumulation paraît être liée à l'activation des phénol-oxydases (tyrosinases) au stade primordia de sclérotés (WONG & WILLETTTS, 1974).

Sur le milieu de croissance MCA, les hyphes végétatives présentent à leur apex de gros globules lipidiques fortement osmiophiles qui seraient principalement composés d'acides gras insaturés [NAJIM & TURIAN, 1979a]. Par opposition, les hyphes intra-hyphales des primordia de sclérotés, formés sur le même milieu MCA, contiennent des globules lipidiques dont la densité électronique est relativement fai-

ble. On pourrait donc supposer que les globules lipidiques des sclérotés sont composés d'acides gras saturés.

Dans les primordia, ces lipides semblent constituer la principale source de réserve ; toutefois, à ce stade de développement, on n'observe pas de contiguïté entre les microcorpuscules (« microbodies ») et les globules lipidiques. Les microcorpuscules, chez le *S. fructigena*, deviennent proéminents dans les primordia de sclérotés [NAJIM & al., 1979].

Sur le plan physiologique, CHET & HENIS (1975) ont mis en évidence un cycle glyoxylique lors de la genèse des sclérotés chez le *Sclerotinia rolfii*. Cependant, CHET & al. (1972) et MURAKAWA & al. (1975) notent que l'activité de la peroxydase chez le *Sclerotinia* augmente du stade primordia à la maturation.

Ainsi, les microcorpuscules observés dans les primordia seraient probablement des péroxysomes du fait même de la non contiguïté avec les globules lipidiques. Par contre, il n'est pas exclu que lors de la germination des sclérotés, et avec les lipides comme principale source de carbone, que l'activité glyoxylique n'apparaisse pas.

La modification structurelle touchant le réticulum endoplasmique qui s'organise sous la forme d'un dictyosome est décrite pour la première fois ; cette structure semble être typique aux sclérotés. Probablement qu'à ce stade de différenciation, les empilements de saccules du réticulum endoplasmique lisse doivent jouer un rôle dans les sécrétions et les synthèses.

Parallèlement, des formations de microfilaments sont observées dans les hyphes où la croissance est limitée. A l'opposé, dans les hyphes végétatives en pleine croissance, ces formations para-cristallines se présentent rarement. Ces formations semblent être dissociées dans le cytoplasme des hyphes végétatives sous la forme de microfilaments de 70 Å de diamètre et ces derniers, en association avec les microtubules (cytoplasmiques ou nucléaires), joueraient probablement un rôle dans le déplacement des organites (Figs. 16, 17) ou dans les courants protoplasmiques. En outre, des formations de ce type s'accumulent dans les hyphes végétatives placées dans des conditions limitantes pour la croissance [BECK & al., 1970 ; ALLEN & al., 1974 ; TANAKA & MIZUGANA, 1974 ; OULEVEY & al., 1978] et dans certains cas dans les noyaux [BECK & al., 1970 ; VAN WINKLE & al., 1971 ; ALLEN & al., 1974 ; TANAKA & MIZUNAGA, 1974].

En effet, dans les hyphes végétatives en pleine croissance (MCA), on trouve peu de ces formations para-cristallines, mais des microfilaments dissociés [NAJIM & TURIAN, 1979a ; NAJIM, 1979] ; ce qui nous amène à penser que les courants protoplasmiques sont liés à la dissociation partielle de formations para-cristallines en microfilaments ; notons que ces derniers ont été identifiés comme étant de l'actine chez le *Neurospora* [ALLEN & SUSSMAN, 1978 ; SIKORA & MARZLOUF, 1982].

Les mitochondries, dans les primordia de sclérotés, ont tendance à présenter des corps myéliniques ou « worls ». Selon BECK & GREENAWALT (1976), ces formations en « worls » pourraient être constituées de phospholipides.

CONCLUSION

De nombreuses transformations ultrastructurales sont mises en évidence lors de la différenciation des primordia de sclérotés :

— la paroi des hyphes s'épaissit, et la synthèse pariétale n'est pas inhibée, ce qui favorise la septation et le développement des hyphes intra-hyphales ;

— les parois de certaines hyphes du cortex subissent une mélanisation, cette dernière pourrait prévenir la dessiccation des sclérotés ;

— les hyphes principales contenant les hyphes intra-hyphales subissent un colmatage de leurs structures, par un ciment à forte densité électronique, ce dernier pourrait être constitué de mélanines. Par ailleurs, le système endomembranaire, subit aussi des transformations :

- empilement de saccules de réticulum endoplasmique ;
- présence de deux types de vacuoles ;
- participation de l'enveloppe nucléaire à la formation du système vacuolaire.

Certains noyaux présentent des invaginations de membranes (NAJIM, 1982a), par contre d'autres deviennent quiescents et sphériques. Les mitochondries ont moins de crêtes, elles présentent des structures similaires aux corps myéliniques.

En conclusion, toutes ces transformations montrent qu'un nouvel équilibre physiologique se crée, avec une élimination des organites en excès (activité du système vacuolaire, colmatage des hyphes principales) et la préservation d'un minimum de structures vivantes (restructuration du système endomembranaire, des noyaux et des hyphes intra-hyphales).

La biogenèse des sclérotés peut donc se résumer comme suit : une condensation de structures vivantes et une élimination de la matière en excès par voie lytique.

REFERENCES

- ALLEN E.D., LOWRY S.A. and SUSSMAN A.S., 1974 — Accumulation of microfilaments in a colonial mutant of *Neurospora crassa*. *J. Ultrastruct. Res.* 48 : 455-465.
- ALLEN E.D. and SUSSMAN A.S., 1978 — Presence of an actin-like protein in mycelium of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 135 : 713-716.
- BECK D.P., DECKER G.L. and GREENAWALT J.W., 1970 — Ultrastructure of striated inclusion in *Neurospora*. *J. Ultrastruct. Res.* 33 : 249-251.
- BECK D.P. and GREENAWALT J.W., 1976 — Biogenesis of mitochondrial membranes in *Neurospora crassa* during cellular differentiation. *J. Gen. Microbiol.* 97 : 97-110.
- CALONGE F.D., 1968 — Origin and development of intra-hyphal hyphae in *Sclerotinia fructigena*. *Mycologia* 60 : 932-942.
- CHAN C. and STEPHEN R.C., 1967 — Intra-hyphal hyphae in the genus *Linderina*. *Canad. J. Bot.* 45 : 1995-1998.
- CHET I., RETIG N. and HENIS Y., 1972 — Changes in total soluble proteins and in some enzymes during morphogenesis of *Sclerotium rolfsii*. *J. Microbiol.* 72 : 451-456.
- CHET I. and HENIS Y., 1975 — Sclerotial morphogenesis in fungi. *Annual Rev. Phytopathol.* 13 : 169-192.
- DARGENT R., CHAVANT L., FONVIELLE J.-L. et WOLF C., 1984 — Influence d'un facteur physique : la température sur l'ultrastructure de l'*Aspergillus ochraceus*. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., Sér III*, 299 : 831-836.
- FORLAY J.F., JERSILD R.A. and NIEDERPRUEM D.J., 1975 — Origin and ultrastructure of intra-hyphae in *Tricophyton terrestre* and *T. rubrum*. *Arch. Microbiol.* 106 : 195-200.
- HOFFMAN G.P., 1972 — Heterokaryose bei *Monilia fructigena*. *Phytopathol. Z.* 73 : 326-340.

- LOWRY R.J. and SUSSMAN A.S., 1966 — Intra-hyphal hyphae in « Clock » mutant of *Neurospora*. *Mycologia* 58 : 541-548.
- MURAKAWA S., FUNAKAWA S. and SATOMURA Y., 1975 — Role of sclerin on morphogenesis on *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary (including *S. libertiana* Fuckel). *Agric. Biol. Chem.* 39 : 645-650.
- NAJIM L., 1979 — Contrôle morphogénétique et études ultrastructurales d'une moisissure, le *Sclerotinia fructigena* (Aderh-Ruhl) agent de la moniliose des arbres fruitiers. Swit., University of Geneva, n° 1926.
- NAJIM L., ORTEGA-PEREZ R., VANDERHAGUE F. and TURIAN G., 1979 — Identification of microbodies as peroxysomes in *Sclerotinia fructigena* (Aderh-Ruhl) by cytochemistry and isopycnic centrifugation. *Proc. Roy. Microscop. Soc.* 14 : 4.
- NAJIM L. et TURIAN G., 1979a — Ultrastructure de l'hyphe végétative de *Sclerotinia fructigena*. *Canad. J. Bot.* 57 : 1299-1313.
- NAJIM L. and TURIAN G., 1979b — Conidiogenous loss of structurofunctional polarity in the hyphal tips of *Sclerotinia fructigena*. *Eur. J. Cell Biol.* 20 : 24-27.
- NAJIM L., 1982a — Nuclear membrane behaviour in *Sclerotinia fructigena*. *Microbios Letters* 22 : 85-97.
- NAJIM L., 1982b — Localization of microvesicles in Fungus cell wall. I. In germinating conidia of *Sclerotinia fructigena*. *Microbios Letters* 22 : 107-115.
- NAJIM L., 1982c — Localization of microvesicles in fungus cell wall. II. Relation to pathogenesis. *Microbios Letters* 22 : 143-149.
- NAJIM L., 1987 — Contrôle morphogénétique de la différenciation des sclérotes de *Sclerotinia fructigena* : I. Etudes physiologiques. *Cryptogamie, Mycol.* 8 : 209-217.
- OULEVEY N., DICKER J.W. and TURIAN G., 1978 — Striated inclusion and defective mitochondria in the restricted form of the « amycelial » mutant of *Neurospora crassa*. *Experientia* 34 : 840.
- REYNOLDS E.S., 1963 — The use of lead acetate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17 : 208-212.
- SIKORA L. and MARZLOUF G.A., 1982 — Identification and isolation of actin from *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 128 : 439-445.
- SPURR A.R., 1969 — A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26 : 31-43.
- TANAKA K. and MIZUNAGA T., 1974 — Striated and crystalline inclusions in the nuclei and cytoplasm of intact yeast protoplasts. *J. Ultrastruct. Res.* 48 : 124-127.
- VAN WINKLE W.B., BIESELE J.J. and WAGNER R.P., 1971 — The mitotic apparatus of *Neurospora crassa*. *Canad. J. Genet. Cytol.* 13 : 873-888.
- WILLETTS H.J., 1968a — The development of stromata of *Sclerotinia fructigena* and related species. I. In culture. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 51 : 625-632.
- WILLETTS H.J., 1968b — The development of stromata of *Sclerotinia fructigena* and related species. II. In fruits. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 51 : 633-642.
- WILLETTS H.J., 1969 — The development of stromata of *Sclerotinia fructigena* and related species. III. Further observations and conclusions. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 52 : 309-314.
- WILLETTS H.J., 1972 — The morphogenesis and possible evolutionary origins of fungal sclerotia. *Biol. Rev.* 47 : 515-536.
- WILLETTS H.J., 1978 — Sclerotium formation. In : SMITH J.E. & BERRY D.R., *The Filamentous Fungi*, Vol. III. London, E. Arnold : 197-211.
- WONG A.L. and WILLETTS H.J., 1974 — Polyacrylamide-gel electrophoresis of enzymes during morphogenesis of Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Gen. Microbiol.* 103 : 77-83.

ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LES FIGURES

Cih	ciment inter-hyphal	Mb	microcorpuscule
COR	cordon	ME	médulla
CO	cortex	N	noyau
F	faisceau de microfilaments	n	nucléole
g	granulations	P	paroi
H	hyphe mélanisée	Re	réticulum endoplasmique
HM	automélanisation	S	septum
L	globule lipidique	v	vacuole
M	mitochondrie	W	corps de Woronin

ABBREVIATIONS USED IN FIGURES

Cih	inter-hyphal cement	Mb	microbodies
COR	strand	ME	medulla
CO	cortex	N	nuclei
F	bundle of microfilaments	n	nucleoli
g	granulations	P	wall
H	melanized hyphae	Re	endoplasmic reticulum
HM	automelanization	S	septum
L	lipid globule	v	vacuole
M	mitochondria	W	woronin body

- Fig. 1 – Sclérote en coupe transversale, observé au microscope électronique à balayage : on distingue le cortex (CO) et la médulla (ME).
- Fig. 2 – Agrandissement de la zone intermédiaire entre le cortex et la médulla. Le cortex est formé d'hyphes associées en cordons.
- Fig. 3 – Détail des cordons (COR), espaces libres entre les cordons.
- Fig. 4 – Détails de la médulla : hyphes baignées dans un ciment inter-hyphal (Cih). Plusieurs hyphes paraissent colmatées.
- Fig. 5 – Détail de la surface d'un sclérote formé dans le substratum : sclérote à cortex lisse et réduit : hyphes colmatées et s'entrecroisant (H).
- Fig. 6 – Début de différenciation de sclérote (Primordium). Hyphes qui s'entrecroisent, et accumulation de mucopolysaccharides.
- Fig. 7 – a. Biogenèse des sclérotés : primordium. Hyphes à parois épaisses et mélanisées, accumulation du ciment inter-hyphal, ramification des hyphes. b. Large hyphe à paroi épaisse (P) et automélanisation (HM).
- Fig. 8 – Coupe à travers un primordium de sclérotés (après 4 jours de transfert) (même type de structures que dans la figure 7). Formation du cortex avec des hyphes fortement mélanisées (HM) dont les divers organites sont colmatés. Paroi épaisse (P), forte accumulation du ciment inter-hyphal (Cih), vacuolisation intensive dans les hyphes du cortex (v). Les noyaux sont sphériques (N). Forte agglutination des hyphes de la médulla et développement des hyphes intra-hyphales.
- Fig. 9 – Coupe longitudinale d'une hyphe de la médulla. Hyphe intra-hyphale dont la structure est préservée, contenue dans une hyphe mélanisée (HM). Paroi épaisse des deux hyphes.
- Fig. 10 – Coupe d'une hyphe du cortex. Plusieurs vacuoles à contenu très dense aux électrons (v). Cytoplasme riche en polysomes. Paroi épaisse avec une forte accumulation du ciment inter-hyphal (Cih).

- Fig. 11 — Coupe transversale d'une hyphe de la médulla. Hyphe intra-hyphale avec des globules lipidiques, des mitochondries [M] et des vacuoles [v]. Structures entièrement mélanisées de l'hyphe principale (HM). Paroi épaisse des deux hyphes [P].
- Fig. 12 — Détail de la structure d'une hyphe intra-hyphale. Nombreux globules lipidiques [L], vacuoles à contenu dense aux électrons [v], mitochondries [M], microcorpuscules [Mb] au voisinage des mitochondries et de nombreux polysomes.
- Fig. 13 — Coupe transversale d'une hyphe de la médulla. Hyphe intra-hyphale, avec un noyau [N] et un microcorpuscule [Mb], comprimant les structures entièrement mélanisées de l'hyphe principale où subsistent encore des globules lipidiques.
- Fig. 14 — Hyphe intra-hyphale avec des mitochondries montrant des figures myéliniques [flèche].
- Fig. 15 — Coupe longitudinale d'une hyphe de la médulla. Nombreux noyaux dans cette hyphe [N]. Noyau passant à travers un pore septal. Les flèches montrent les « pressions » que peut avoir subi le noyau et donc le sens de déplacement de ce dernier. Microcorpuscule fortement développé (Mb), saccules du réticulum endoplasmique empilés (Re), faisceau de microfilaments en coupe transversale [F], granulations [g] observées le long du septum épais [S].
- Fig. 16 — Détail de la figure 15. Pression exercée sur le noyau montrant dans quel sens le noyau se déplace (double flèche).
- Fig. 17 — Empilement de saccules de réticulum endoplasmique lisse. Saccules du réticulum, fenestrés à leurs extrémités [flèche].
- Fig. 18 — Huit saccules du réticulum endoplasmique [Re] empilés les uns sur les autres à la manière d'un appareil de Golgi.
- Fig. 19 — Accumulations fibrillaires : coupe longitudinale au niveau d'un faisceau de microfilaments formant un véritable réseau [F].
- Fig. 20 — Coupe transversale montrant l'organisation pseudo-cristalline des microfilaments [F].
- Fig. 21 — Corps myélinique (« worts ») intra-mitochondrial [M].
- Fig. 22 — Système vacuolaire (v) se formant à partir de l'enveloppe nucléaire [N].
- Fig. 23 — Mitochondrie séquestrée par l'enveloppe nucléaire.
- Fig. 24 — Vacuole autophagique développée par l'enveloppe nucléaire (double flèche). La lumière de la vacuole est légèrement transparente aux électrons [v].
- Fig. 25 — Mitochondrie digérée par une vacuole autophagique (double flèche).
- Fig. 26 — Vacuole autophagique à un stade avancé, avec des dépôts denses aux électrons et un corps myélinique.

Fig. 1 — Transversal section of sclerotia, observed with scanning electron microscope. Cortex [CO] and medulla [ME] are clearly seen.

Fig. 2 — High magnification of the junction zone between cortex and medulla. Cortex is constituted by strands of hyphae.

Fig. 3 — Detail of strands (COR), empty spaces between strands.

Fig. 4 — Detail of medulla : hyphae are plunged in an inter-hyphal cement (Cih). Several hyphae appear to be clogged.

Fig. 5 — Sclerotia formed in the substratum. Detail of sclerotia surface, the cortex is smooth and reduced in thickness ; hyphae are clogged and cross one another [H].

Fig. 6 — First state of sclerotia differentiation (primordium). Hyphae that intersect and accumulation of mucopolysaccharides.

- Fig. 7 — a. Sclerotia biogenesis ; primordium. Hyphae with thick and melanized walls. Accumulation of inter-hyphal cement, ramification of hyphae. b. Large hyphae with thick walls (P). Automelanization of hyphae (HM).
- Fig. 8 — Section through a sclerotium primordia (4 days of shift-down ; same structures as in figure 7). Cortex formation : highly melanized hyphae (HM) with clogged organelles. Thick wall (P) ; accumulation of inter-hyphal cement (Cih) ; intensive vacuolization of cortex hyphae (v). Nuclei are spherical (N). High agglutination of medulla and formation of intra-hyphal hyphae.
- Fig. 9 — Longitudinal section of medulla hyphae. Intra-hyphal hyphae where all the structures are preserved and included in a melanized hyphae (HM) ; thick walls of the two hyphae (P).
- Fig. 10 — Section of cortex hyphae. Several vacuoles with electron dense material inside (v). The cytoplasm contains several polysomes. Thick wall and accumulation of inter-hyphal cement (Cih).
- Fig. 11 — Transversal section of medulla hyphae. Intra-hyphal hyphae with lipid globules and mitochondria (M) and vacuoles (v). Principal hyphae (HM) where all structures are melanized. Thick walls of both hyphae.
- Fig. 12 — Ultrastructure of intra-hyphal hyphae. Numerous lipid globules (L), vacuoles with electron dense content (v), mitochondria (M), microbodies (Mb) near mitochondria and numerous polysomes.
- Fig. 13 — Transversal section of medulla hyphae. Intra-hyphal hyphae with nucleus (N) and microbody (Mb) compressing the melanized structure of the principal hyphae where subsist some lipid globules.
- Fig. 14 — Intra-hyphal hyphae with mitochondria showing myelin figures inside (arrow).
- Fig. 15 — Longitudinal section of medulla hyphae. Numerous nuclei (N) in this hyphae. Nucleus passing through the septal pore. Arrows show the pressions to which the nucleus is submitted and the removal direction of this later. Large microbody (Mb). Flattened cisterna of endoplasmic reticulum stacked (Re) ; transversal section of microfilament bundle (F), granulations (g) in a thick septum (S).
- Fig. 16 — Detail of figure 15, showing the thick septum and the nucleus passing through the septal pore and the direction of removal [double arrow].
- Fig. 17 — Cisterna of smooth endoplasmic reticulum. Cisterna fenestrated at the extremities (arrow).
- Fig. 18 — Eight cisterna of endoplasmic reticulum (Re) stacked. Cisterna fenestrated as a Golgi apparatus.
- Fig. 19 — Fibrillar accumulations : longitudinal section through bundle of filaments (F).
- Fig. 20 — Transversal section of bundle showing pseudo-cristalline organization of microfilaments.
- Fig. 21 — Myelin figures (« Whorls ») inside mitochondria (M).
- Fig. 22 — Formation of vacuolar system from the endomembranes : nuclear membrane (N).
- Fig. 23 — Mitochondria sequestered by nuclear envelope.
- Fig. 24 — Autophagic vacuole (v) in contact with nuclear envelope [double arrow].
- Fig. 25 — Mitochondria digested by an autophagic vacuole [double arrow].
- Fig. 26 — Advanced stage of autophagic vacuole with electron dense deposit and myelin figures.



























